

学位論文の要旨

論文題目 摂食関連受容体 MCHR1 の細胞内分子メカニズム解明

広島大学大学院総合科学研究科

総合科学専攻

学生番号 D120903

氏 名 濱本 明恵

論文の要旨

序論

メラニン凝集ホルモン (MCH) は哺乳類において視床下部外側野に局在し、脳内の広範囲に渡って投射する神経ペプチドである。MCH 受容体 (MCHR) は MCHR1 と MCHR2 の二種類が存在し、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のクラス A に属する。GPCR は細胞膜を 7 回貫通する構造であり、細胞外ドメインにリガンドが結合すると立体構造が変化し、直ちに細胞内で G タンパク質と共役することで情報伝達を行う。G タンパク質 α サブユニットは複数のファミリーに分類され、それぞれ下流の情報伝達系が異なる。遺伝子改変動物や選択的アンタゴニストを用いた行動実験から、MCH-MCHR1 系は摂食行動やエネルギー代謝に加えて、うつ不安にも重要な役割を担うことが報告された。従って MCHR1 は、摂食や情動が関与する疾患に対する治療の創薬ターゲットとして注目を浴びている。

受容体を構成するどのアミノ酸残基が如何なる受容体機能を担うのかといった、受容体の構造と機能の相関関係を構造活性相関と呼ぶ。哺乳類 MCHR1 において構造活性相関の解明が進展しているが、細胞内で共役する G タンパク質の種類がどのように決定付けられるかという「G タンパク質選択機構」及び不活性状態から活性状態への状態遷移の過程を示す「構造ダイナミクス」に関しては未だ不明であり、重要な課題である。そこで本研究では、これらの疑問点を明らかにすることを目的として、第 I 章では、キンギョ MCHR の細胞内情報伝達系を解析した。そしてキンギョで新規に見出した自身の研究成果を基に、第 II 章では哺乳類 MCHR1 における Gi/o 選択的共役に重要なアミノ酸、第 III 章では Gq 選択的活性に重要なアミノ酸の解明を試みた。

第 I 章 魚類 MCH 受容体の情報伝達系解析

まず、G タンパク質選択機構解明の礎となる研究として魚類 MCHR の細胞内情報伝達系の解析を行った。魚類において MCH は一般的に体色明化作用が知られている。また MCH の摂食調節能に着目すると、哺乳類 (摂食亢進) とキンギョ (摂食抑制) 間で反対の効果を示す。この要因の一つとして、MCHR の細胞内情報伝達系の違いが想定された。そこで、キンギョ MCHR1 又はキンギョ MCHR2 が安定高発現したヒト

胎児由来腎臓（HEK293T）細胞を用いて、細胞内情報伝達系を解析した。その結果、キンギョ MCHR1 は MCH 刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、ERK1/2 のリン酸化及び弱い cAMP 産生を示した。但し、cAMP 量測定における EC50 値は内在性リガンドに対する値としては非常に高いため、cAMP 産生の起点となる Gs 共役の生理的意義については注意を要する。また、上述した各シグナル反応が Gi/o を特異的に不活性化させる百日咳毒素（PTX）に非感受性であったことから、キンギョ MCHR1 は主に Gq と共役することが判明した。一方、キンギョ MCHR2 も細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、ERK1/2 リン酸化を示したが、cAMP 産生抑制及び PTX 感受性を有することから、Gi/o 及び Gq 共役能を持つことが認められた。哺乳類 MCHR1 は Gi/o 及び Gq と共役し、ヒト MCHR2 は Gq と共役する。即ち、哺乳類と魚類間で MCHR の G タンパク質選択性が異なることを明らかにした。私の調べた限り、ペプチド受容体において、哺乳類と魚類間で G タンパク質選択性が異なる例は当研究が初と考えられる。さらに哺乳類 MCHR1 のアゴニスト及びアンタゴニストの魚類 MCHR に対する効果の検討も試みた。哺乳類 MCHR1 選択的アゴニスト Compound.15 はキンギョ MCHR1 に対して強いアゴニスト効果を示したが、キンギョ MCHR2 においても弱い cAMP 産生抑制を示すことが分かった。また、哺乳類 MCHR1 選択的アンタゴニスト Compound.30 はキンギョ MCHR1 に対して、活性は弱い選択的なアゴニストであることを見出した。これらの化合物をキンギョの行動実験に用いることで、キンギョ MCHR が担う、それぞれの生理機能の解明が期待される。本研究成果は、魚類 MCHR の細胞内シグナル経路を詳細に調べた初の報告であり、生物種を超えた MCH-MCHR 経路の統合的理解に繋がるものである。

第Ⅱ章 哺乳類 MCHR1 における G タンパク質選択機構の解明

多くの GPCR は、複数種の G タンパク質を介して活性化される。同じ GPCR においても、共役した G タンパク質の種類によって生じる下流の情報伝達系が全く異なることから、この違いが多様な生理機能を制御する可能性がある。しかし、G タンパク質選択性を決定する受容体側の特定のアミノ酸残基の予測は非常に難しく、実験により明らかにされた例も数例しか存在しない。哺乳類 MCHR1 においても構造活性相関の研究が進展しているにも拘らず、未だ解決されていない課題が G タンパク質選択機構に重要なアミノ酸領域の同定である。即ち、哺乳類 MCHR1 は Gi/o 及び Gq の 2 種類の G タンパク質と共役し得るが、受容体のどのドメインが両者を選択的に認識しているか全く不明である。そこで、第Ⅰ章において判明した G タンパク質選択性の違いを活用し、ラット MCHR1 のアミノ酸配列をキンギョの配列に置換することで、Gi/o 共役能が消失する可能性を考えた。そして、細胞内ループ領域近傍に着目した置換体を作製し、それぞれを HEK293T 細胞に一過性発現させて Gi/o 活性を評価した。その結果、Gq 活性に影響を与えることなく、Gi/o 活性低下を示す 2 つの置換体（i2_6sub、i3_6sub）を同定した。i2_6sub は細胞内第 2 ループ領域のアミノ酸 6 残基を、i3_6sub は細胞内第 3 ループ領域の 4 残基及び第 5 膜貫通領域の 2 残基を同時に置換した置換体である。これらは細胞内 Ca^{2+} 動員能測定において PTX 感受性低下を示し、Gi/o 活性低下が示唆された。さらに、Gi/o 活性選択的な GTPγS 結合能測定及び cAMP 量測定、統合的な細胞内応答を評価する Dynamic mass redistribution（DMR）アッセイにおいても、i2_6sub と i3_6sub は Gi/o 活性低下が認められた。置換体の置換箇所の内、アミノ

酸 4 残基の置換では活性低下を示さないことから、複数のアミノ酸から形成される立体構造が Gi/o との選択的共役に関与していると推測された。本研究成果は、MCHR1-Gi/o 相互作用の 3 次元モデル作製や、他の GPCR における G タンパク質選択性の仕組みの理解に貢献することが期待される。

第Ⅲ章 哺乳類 MCHR1 における NPxxY(x)₅₋₆F モチーフの機能解析

クラス A GPCR 間において高度に保存されるアミノ酸配列として、DRY 及び NPxxY(x)₅₋₆F モチーフ、第 2、4-7 膜貫通領域の中央部付近にそれぞれ存在する Pro が挙げられる。これらの配列は保存性の高さから受容体機能に重要な役割を担うことが予測されており、実際に哺乳類 MCHR1 において、DRY と Pro は細胞内シグナル伝達などに重要であることが示されている。しかしながら、哺乳類 MCHR1 における NPxxY(x)₅₋₆F モチーフの役割は不明であったため、当該モチーフの機能解析を行った。NPxxY(x)₅₋₆F モチーフをそれぞれ Ala に置換し、HEK293T 細胞に一過性発現させて細胞内 Ca²⁺濃度測定を行った結果、F318A のみ機能低下を示さなかった。さらに、Phe318 を様々なアミノ酸に置換し、同様に実験を行ったところ、F318K は有意な機能亢進を示すことを見出した。次に、Gi/o 活性選択的な GTPγS 結合能測定において、F318K は機能亢進を示さなかったため、F318K は Gi/o ではなく Gq 選択的に親和性が上昇することが推測された。さらに、F318K-Gq 及び Gi の 3 次元相同モデルから、F318K-Gq 間における水素結合が予測され、Gq 選択的な機能亢進を支持する結果を得た。加えて、他の GPCR との配列を比較した解析によると、F318K の Gq 選択的な機能亢進には MCHR1 の細胞内第 1 ループ領域に存在する Trp73、Asp79 と Gq における Asn357 が重要であると予測された。GPCR 間で高度に保存されたアミノ酸残基を置換することで、機能亢進を示した本研究は非常に稀な例である。即ち、本研究成果は、NPxxY(x)₅₋₆F モチーフにおける Phe 残基の G タンパク質活性における重要性を理解する上で、新たな知見となり得る。以上より、哺乳類 MCHR1 において、不活性型から活性型への変換機構における構造ダイナミクス解明に貢献する結果が得られた。

総合考察

本研究により、「魚類（キンギョ）MCH-MCHR 系の細胞内情報伝達系」及び「哺乳類 MCHR1 において Gi/o 又は Gq を選択的に活性化する際の構造動態の一端」を明らかにした。得られた解析結果は、他の GPCR における構造活性相関の研究に対して重要な知見をもたらすであろう。さらに、本研究では Gq 活性が優勢となる MCHR1 置換体 3 種類の作出に成功した。これら置換体ノックインマウスを作製することで、今まではアプローチが困難であった、哺乳類 MCHR1 に共役する Gi/o と Gq がそれぞれ担うシグナル伝達の詳細や生理機能の解明に繋がることが期待される。リガンドの種類により Gi/o、Gq の活性を選択的に制御出来れば、ある生理現象のみ（肥満又はうつ等）により効果的で副作用の少ない治療薬開発に繋がる。従って、本研究成果は基礎研究として非常に重要である GPCR の G タンパク質選択機構解明のみならず、肥満及びうつ不安の改善に貢献することも期待されるものである。